

ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD
 ACCESSION NUMBER: 1990-087311 [12] WPIDS
 DOC. NO. CPI: C1990-038455
 TITLE: Complex of fibroblast growth factor (FGF) mutein - and
 its stable compsns. with glycosaminoglycan in aq.
 medium.
 DERWENT CLASS: B04 D16
 PATENT ASSIGNEE(S): (TAKE) TAKEDA CHEM IND LTD
 COUNTRY COUNT: 1
 PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG
JP 02040399	A	19900209	(199012)*		

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
JP 02040399	A	JP 1988-187367	19880727

PRIORITY APPLN. INFO: JP 1988-187367 19880727

AN 1990-087311 [12] WPIDS.

AB JP 02040399 A UPAB: 19930928

A complex of FGF mitein and glycosaminoglycan or a compsn. contg. them is novel. Also claimed is a method for the prepn. of the compsn. FGF mitein by contact with glycosaminoglycan in an aq. medium.

USE/ADVANTAGE - FGF mitein is stable in the novel compsn.

In an example, M 13 vector of human bFGF gene is cloned. It is used as the template for site-directed mutagenesis. Mutagenised plaque is screened and identified. Gene coding human bFGF mitein is expressed in E. coli to give rhbFGF mitein CS23 (I). (I) is added to 20 mM phosphate buffer to 200 microg/ml. Heparin Na (II) (M.W.: 5000 to 25000) is added to it to 200 microg/ml and incubated at 37 deg C for 48 hrs.. The residual FGF activity is 100% after 48 hrs., compared to 3% for the control with no addn. of (II). The FGF activity is determined by using bovine fetal heart endothelial cell.

Heparan sulphate Na and dermatan sulphate Na also show 100% activity after 48 hrs. in a Dulbecco MEM medium contg. 10% bovine fetal serum.
0/0

ANSWER 1 OF 1 JAPIO COPYRIGHT 1999 JPO and Japio
 ACCESSION NUMBER: 90-040399 JAPIO
 TITLE: COMPLEX OR COMPOSITION OF FIBROBLAST CELL GROWTH
 FACTOR MUTEIN
 INVENTOR: KATO KOICHI; KAWAHARA KENJI; KAJIO TOMOKO
 PATENT ASSIGNEE(S): TAKEDA CHEM IND LTD, JP (CO 000293)
 PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	ERA	MAIN IPC
JP 02040399A1	Heisei	19900209	(5)	C07K013-00

APPLICATION INFORMATION

STN FORMAT:	JP 88-187367	19880727
ORIGINAL:	JP63187367	Heisei
SOURCE:	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Unexamined Applications, Section: C, Sect. No. 712, Vol. 14, No. 197, P. 155 (19900423)	

INT. PATENT CLASSIF.:

MAIN:	(5) C07K013-00
SECONDARY:	(5) A61K037-02; (5) A61K037-02; (5) A61K037-02; (5) A61K037-02; (5) A61K037-02; (5) C12N015-12; (5) C12P021-02

CLASSIFICATION: 14.1 ORGANIC CHEMISTRY - Organic compounds

14.4 ORGANIC CHEMISTRY - Medicines

CONTROLLED TERM: R059 MACHINERY - Freeze-drying

ABSTRACT:

NEW MATERIAL: A complex of fibroblast cell growth factor(GOF) and glycosaminoglycan.

USE: A healing promoter of burn, wound and postoperative tissue and remedy for thrombosis and arteriosclerosis by regeneration action of blood-vessel.

PREPARATION: For example, a plasmid containing DNA coding a human basic fibroblast cell growth factor (human bFGF) is digested with a restriction enzyme and bonded with a proper phage vector and then inserted into Escherichia coli bacterium to transform the bacterium and the bacterium is sown on a plate and plaque containing recombinant phage is picked up and a basic sequence of recombinant part is decided by dideoxynucleotide synthesis chain stopping method and a clone having human bFGFDNA is selected. Then the clone is cultured and a human bFGF murein is collected and brought into contact with glycosaminoglycan (e.g., heparin) in an aqueous medium to provide the aimed complex.

ANSWER 1 OF 1 HCPLUS COPYRIGHT 1999 ACS

ACCESSION NUMBER: 1990:546034 HCPLUS

DOCUMENT NUMBER: 113:146034

TITLE: Manufacture of stabilized fibroblast growth factor mutant-glycosaminoglycan complex or composition

INVENTOR(S): Kato, Koichi; Kawahara, Kenji; Kajio, Tomoko

PATENT ASSIGNEE(S): Takeda Chemical Industries, Ltd., Japan

SOURCE: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 14 pp.

CODEN: JKXXAF

DOCUMENT TYPE: Patent

LANGUAGE: Japanese

FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1

PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 02040399	A2	19900209	JP 1988-187367	19880727 <--

AB The title complex or compn. is manufd. by mixing fibroblast growth factor mutant with glucosaminoglycans (i.e. heparin, heparan sulfate, dermatan sulfate) in an aq. medium. Thus, recombinant fibroblast growth factor mutant in pH 7.4 phosphate buffer was incubated with Na heparin at 37.degree. for 48 h. At 1:1 mol ratio, the compn. (or complex) retained 100% of the growth factor activity vs. 3% for the control. A stable injection contained recombinant fibroblast growth factor mutant 0.5, Na heparin sulfate 0.37, and Na citrate 15 mg.

ANSWER 1 OF 1 DGENE COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

ACCESSION NUMBER: 1990N-Q03580 DNA DGENE

TITLE: Complex of fibroblast growth factor (FGF) murein - and its stable compsns. with glycosamino glycan in aq. medium

PATENT ASSIGNEE: (TAKE)Takeda Chemical Ind. KK

PATENT INFO: JP 02040399 A 19880209 14p

APPLICATION INFO: JP 1988-187357 19880727

PRIORITY INFO: JP 1988-187367 19880227

PAT. SEQ. LOC: Disclosure; Fig 1

DATA ENTRY DATE: 02 AUG 1989 (first entry)

DOCUMENT TYPE: Patent

LANGUAGE: Japanese

OTHER SOURCE: 1990-087311 [12]

CROSS REFERENCES: P-PSDB: 1990P-R05545

DESCRIPTION: Fibroblast growth factor mutant

KEYWORD: Fibroblast growth factor mutant; glycosaminoglycan; bFGF; ss

ORGANISM: Homo sapiens

ABSTRACT:

Compsn. contg. FGF murein and glycosaminoglycan in aq. medium produce stable FGF murein

NUC!KN ACID COUNTS: 121 A; 105 C; 118 G; 100 T;

SEQUENCE LENGTH: 444

SEQUENCE

1 atgccagcat tgcccggaga tggcgccagc ggccgccttcc cgccccggcca
51 cttcaaggac cccaaaggcc tcgtactgcaa aaacgggggc ttcttcctgc
101 gcatccaccc cgacggccga gttgacgggg tccgggagaa gagcggaccct
151 cacatcaagc tacaacctca agcagaagag agaggagttg tgtcttatcaa
201 aggagtgtgt gctaaccgtt acctggctat gaaggaagat ggaagattac
251 tggcttctaa atgtgttacg gatgagtgtt tcttttttga acgattggaa
301 tctaataact acaataactta ccggtcaagg aaatacacca gtttgtatgt
351 ggcactgaaa cgaactgggc agtataaaact tggatccaaa acaggacctg
401 ggcagaaagc tatactttt cttccaatgt ctgctaagag ctga

⑪ 公開特許公報 (A) 平2-40399

⑫ Int.Cl.³C 07 K 13/00
A 61 K 37/02

識別記号

ZNA
ABW
ABX
ACB
ADA
ADT

府内整理番号

8318-4H
8615-4C

⑬ 公開 平成2年(1990)2月9日

C 12 N 15/12
C 12 P 21/02

C

6712-4B
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全14頁)

⑭ 発明の名称 線維芽細胞増殖因子ムテインの複合体あるいは組成物

⑮ 特願 昭63-187367

⑯ 出願 昭63(1988)7月27日

⑰ 発明者 加藤 光一 兵庫県川辺郡猪名川町伏見台1丁目2番地の49

⑰ 発明者 河原 賢治 大阪府和泉市伏屋町428番地の57

⑰ 発明者 銀治尾 知子 大阪府箕面市瀬川1丁目7番地の11

⑰ 出願人 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号

⑰ 代理人 弁理士 岩田 弘

明細書

1. 発明の名称

線維芽細胞増殖因子ムテインの複合体あるいは組成物

2. 特許請求の範囲

- (1)、 線維芽細胞増殖因子(FGF)ムテインとグリコサミノグリカンとの複合体あるいはこれらを配合した組成物。
- (2)、 FGFムテインが、少なくとも1種のヒト型基性FGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインである請求項1記載の複合体あるいは組成物。
- (3)、 グリコサミノグリカンがヘパリン、ヘパラン硫酸またはデルマクン硫酸である請求項1記載の複合体あるいは組成物。
- (4)、 さらに二または三塩基性カルボン酸を配合した請求項1記載の組成物。

- (5)、 線維芽細胞増殖因子(FGF)ムテインとグリコサミノグリカンとを水性媒体中で接触させることを特徴とするFGFムテインとグリコサミ

ノグリカンとの複合体あるいはこれらを配合した組成物の製造法。

(6)、 FGFムテインが、少なくとも1種のヒト型基性FGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインである請求項1記載の製造法。

(7)、 グリコサミノグリカンがヘパリン、ヘパラン硫酸またはデルマクン硫酸である請求項1記載の製造法。

(8)、 さらに二または三塩基性カルボン酸を配合した請求項1記載の製造法。

(9)、 線維芽細胞増殖因子(FGF)ムテインとグリコサミノグリカンとを水性媒体中で接触させることを特徴とするFGFムテインの安定化方法。

(10)、 FGFムテインが、少なくとも1種のヒト型基性FGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインである請求項1記載の安定化方法。

(11)、 グリコサミノグリカンがヘパリン、ヘパラン硫酸またはデルマクン硫酸である請求項1記

の安定化方法。

(12)、FGFムテインにグリコサミノグリカンおよび二または三嗜基性カルボン酸を接触させることによるF9記載の安定化方法。

3. 発明の詳細な説明

実用上の利用分野

本発明は、線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor, 以降 FGFと略称する。)ムテインの安定化方法および安定なFGFムテイン含有複合体あるいは組成物およびこれらの製造法に関する。

従来の技術

FGFは、当初 R A L B / c3 T 3細胞などの線維芽細胞に対して強い増殖促進作用を示す因子として分離された(ブリストロヴィット、ネイチャーナチュア: 249巻、123頁(1974年))。現在では、FGFが、中胚葉由来のはほとんどすべての細胞に対して増殖促進作用を有することが知られている。FGFは、その等電点に基づいて、嗜基性FGF(以下、bFGFと略称する。)およ

び酸性FGF(以下、aFGFと略称する。)の2つに大別される。これらのFGFは、血管内皮細胞に対して強い増殖促進作用やプラスミノゲンアクチベーター诱导作用を行るために、血管新生促進剤、創傷治癒剤、抗血栓薬、抗動脈硬化剤などの予防治療薬としての用途が期待されている。

従来から、FGFは動物由来の醣蛋白質、たとえばウシ副腎体、から單一にまで精製されていたが、その供給量には限度があり、また異種動物由来であるために抗原性が懸念されるなどの問題点を行っていた。最近、組換えDNA技術を用いて、クローニングされたヒトFGF遺伝子を微生物や動物細胞で発現させることにより、FGFを大量に生産する方法が開発された(エプス・レターズ(FEBS Letters), 第213巻, 189-194頁(1987年); ヨーロッパ特許出願公開第2371966号公報参照)。

さらに、FGFのアミノ酸配列を修飾することによって、優れた活性を行あるいは安定性が向上したムテインを生産する方法が開発された(日

本特許出願第63-50219号明細書、ヨーロッパ特許出願第88103047、2号明細書、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical and Biophysical Research Communications)第151巻第701~708頁(1988年)。

発明が解決しようとする課題

ところが、FGFムテインは安定性が向上されてはいるものの、水溶液中に急速に失活することがあり、濃縮乾燥操作によっても容易にその生物活性が低下することがある。さらに、煮沸静置など長時間かけてFGFムテインを殺毒する場合には、その間の力価低下が避けられないこともある。

FGFの失活がヘパリンなどのある種のグリコサミノグリカンの添加によって防止できることが報告されている[ジャーナル・オブ・セルラー・フィジオロジー(J. Cellular Physiology)128巻、475頁(1986年)]。

課題を解決するための手段

上記の事情に鑑み、本発明者は歴史研究を進

めたところ、意外にもFGFムテインの水溶液にグリコサミノグリカンを添加することにより、FGFムテインの安定性が著しく増大することを見い出し、これに基づいてさらに研究した結果、本発明を完成した。

本発明は、(1)、FGFムテインとグリコサミノグリカンとの複合体あるいはこれらを配合した組成物;(2)、FGFムテインとグリコサミノグリカンとを水性媒体中で接触させることによるFGFムテインとグリコサミノグリカンとの複合体あるいはこれらを配合した組成物の製造法;および(3)、FGFムテインとグリコサミノグリカンとを水性媒体中で接触させることによるFGFムテインの安定化方法である。

上記FGFとしては、嗜基性のもの(以下、bFGFと略称することもある。)でもよく、酸性のもの(以下、aFGFと略称することもある。)でもよい。

上記FGFは、哺乳動物由来のものが挙げられる。該哺乳動物としては、ヒト、ナル、ブタ、ウシ、

ヒツジ、ウマなどが挙げられる。

該 FGF としては、脳や下垂体などの既にその存在が明らかにされている各種臓器から抽出されるものが挙げられる。

本発明のムテインとしては、上記の FGF のムテインが挙げられる。

本発明で用いられる FGF ムテインとしては、たとえば日本特許出願第 63-50249 号明細書、ヨーロッパ特許出願第 88103047.2 号明細書、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications) 第 151 号第 701~708 頁 (1988 年) に記載のムテインが挙げられる。

たとえば、本発明における FGF ムテインとしては、本来、元のペプチドあるいは蛋白質のアミノ酸配列が変異したものであり、したがって該変異としては、アミノ酸の付加、構成アミノ酸の欠損、他のアミノ酸への置換が挙げられる。

該アミノ酸の付加としては、少なくとも 1 個の

アミノ酸が付加しているものが挙げられる。

該構成アミノ酸の欠損としては、少なくとも 1 個の FGF 構成アミノ酸が欠損しているものが挙げられる。

該他のアミノ酸への置換としては、少なくとも 1 個の FGF 構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているものが挙げられる。

FGF に少なくとも 1 個のアミノ酸が付加しているムテインにおける少なくとも 1 個のアミノ酸としては、ペプチドを発現する際に用いられる開始コードに原因するメチオニンや、シグナルペプチドは含まれないものである。

付加されているアミノ酸の数としては、少なくとも 1 個であるが、FGF の特徴を失わない限り何個でもよい。さらに好ましくは、FGF と相同性(ホモジジー)が認められており、同様の活性を示すタンパクのアミノ酸配列の一端あるいはすべてが挙げられる。

FGF の少なくとも 1 個の FGF 構成アミノ酸が欠損しているムテインにおける欠損している構

成アミノ酸の数としては、FGF の行する特徴を失わない限り何個でもよい。

該欠損している構成アミノ酸の例としては、ヒト FGF のアミノ末端例 1 の残基:

Met - Pro - Ala - Leu - Pro - Glu - Asp - Gly - Gly - Ser.

ヒト FGF のアミノ末端例 14 残基:

¹ Met - Pro - Ala - Leu - Pro - Glu - Asp
- Gly - Gly - Ser - Gly - Ala - Phe - Pro.
ヒト FGF のアミノ末端例 41 残基:

¹ Met - Pro - ² Ala - ³ Leu - ⁴ ... - ¹¹ Val

ヒト FGF のカルボキシル末端例 61 残基:

⁸⁷ Lys - ⁸⁸ Cys - ... - ¹⁴⁶ Lys - ¹⁴⁷ Ser

などが挙げられる。

FGF の少なくとも 1 個の FGF 構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインにおける置換される前の少なくとも 1 個の FGF 構成アミノ酸の数としては、FGF の特徴を失わない限

り何個でもよい。

置換される前の構成アミノ酸の例としては、システイン、システイン以外のものが挙げられる。システインが特に好ましい。置換された前の構成アミノ酸としてシステイン以外のものとしては、アスパラギン酸、アルギニン、グリシン、パリシンなどが挙げられる。

置換される前の構成アミノ酸がシステインである場合には、置換されたアミノ酸としては、たとえば中性アミノ酸が好ましい。該中性アミノ酸の具体例としては、たとえば、グリシン、パリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン、セリン、スレオニン、メチオニンなどが挙げられる。特に、セリン、スレオニンが好ましい。

置換される前の構成アミノ酸がシステイン以外のものである場合には、置換された別のアミノ酸としては、たとえば、アミノ酸の親水性、疎水性あるいは電荷の点で、置換される前のアミノ酸とは異なる性質をもつものを選ぶ。具体的には置換

される前のアミノ酸がアスパラギン酸の場合には、置換されたあとのアミノ酸としてアスパラギン、スレオニン、パリン、フェニルアラニン、アルギニンなどが挙げられるが、特にアスパラギン、アルギニンが好ましい。

置換される前のアミノ酸がアルギニンの場合には置換されたあとのアミノ酸としてグルタミン、スレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸などが挙げられるが、特にグルタミンが好ましい。

置換される前の構成アミノ酸がグリシンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、スレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、セリン、グルタミン酸、アルギニンなどが挙げられ、特にスレオニンが好ましい。

置換される前の構成アミノ酸がセリンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、メチオニン、アラニン、ロイシン、システイン、グルタミン、アルギニン、アスパラギン酸などが挙げられ、特にメチオニンが好ましい。

置換される前の構成アミノ酸がパリンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、セリン、ロイシン、プロリン、グリシン、リジン、アスパラギン酸などが挙げられ、特にセリンが好ましい。

置換される前の元の構成アミノ酸としては、アスパラギン酸、アルギニン、グリシン、セリン、パリンが好ましい。

置換されたあとのアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、スレオニン、メチオニン、セリン、ロイシンが好ましい。

置換されたムチインの最も好ましいものとしては、構成アミノ酸であるシステインがセリンに置換されたものが最も好ましい。

上記の置換においては、2以上の置換を同時に行なってもよい。特に、2または3個の構成アミノ酸が置換されるのが好ましい。

ヌクレオチドは、上記した付加、欠損、置換の2つまたは3つが組み合わざったものでもよい。

ヌクレオチドを製造するためには、特定部位指向

性変異誘発技術(Site-directed mutagenesis)が採用される。該技術は周知であり、アール・エフ・レイナー(Rather, R. F.)及びジェイ・ピー・レコック(Lecocq, J. P.), ジェネティック・エンジニアリング(Genetic Engineering), アカデミックプレス社(1983年)第31-50頁、に示されている。オリゴヌクレオチドに暗示された変異誘発はエム・スマス(Seitz, M.)及びエス・ギラム(Gillam, S.), ジェネティック・エンジニアリング:原理と方法、プレナムプレス社(1981年)3巻 1-32頁に示されている。

ヌクレオチドをコードする構造遺伝子を製造するためには、たとえば、

(a) FGFの構造遺伝子の1本鎖からなる1本鎖DNAを突然変異体オリゴヌクレオチドプライマーと複数形成させる(この1本鎖で代替えベクターシステイン用コドン、又は場合によりこのコドンと結合をつくるアンチセンス・トリプレットを包含する領域に対して上記プライマーは相補的なものである。但し、当該コドンの他のアミノ酸等、

導化用コドン、又は場合によりアンチセンス・トリプレットとの不一致はこの限りでない。)。

(b) DNAポリメラーゼによりプライマーを複数させ、突然変異性ヘテロ二量体(heteroduplex)を形成させる、及び

(c) この突然変異性ヘテロ二量体を複製する。次に、突然変異化された遺伝子を選択するファージDNAを導入し、プラスミドへ組み込む。

このようにして得られたプラスミドで適当な宿主を形質転換し、得られた形質転換体を培地に増殖することにより、ヌクレオチドを製造することができる。

グリコサミノグリカンは、ムコ多糖類とも呼ばれる多糖の一つであり、二糖類がくりかえし反復して結合した分岐のない多糖類から構成される。二つの糖基のうち一つが常にアミノ酸(N-アセチル-D-グルコサミンまたはN-アセチル-D-ガラクトサミン)であることが特徴である。グリコサミノグリカンは通常糖基の多くに硫酸基またはカルボキシル基もしくはその両方を有し

ている。

本発明で用いられるグリコサミノグリカンとしては、上記の特徴を備えたグリコサミノグリカンならばいずれでも良いが、くりかえし二糖類の一方がD-グルクロン酸、L-イズロクロン酸、もしくはD-ガラクトースからなり、もう一方がN-アセチル-D-グリコサミンもしくはN-アセチル-D-ガラクトサミンからなるものが望ましい。これらの組のはかに微量のD-ガラクトース、D-キシロース、D-マンノース、L-フコース、D-ガラクトサミンなどを含育しても良い。また、二糖単位あたり約0.1～3.0個の硫酸基を有しているものが望ましく、分子量は、約1,000～100,000、好ましくは約2,000～50,000の範囲に含まれる。

該グリコサミノグリカンの具体例としては、たとえばヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸などの各種醸器から抽出、精製されるものが挙げられる。さらに、過酸化水素等を用いて低分子化した低分子ヘパリン、低分子ヘパラン硫酸などが挙げられる。

該三塩基性カルボン酸としては、たとえばクエン酸、イソクエン酸などが挙げられる。

上記カルボン酸は遊離のものでも良く、塩の形のものでもよい。該塩としてはたとえばナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。

また、水媒体にカルボン酸の遊離のものを加え、次いで適当量のアルカリまたは酸を加えて所望のpHにしてよい。アルカリを加えることにより、水媒体中で、カルボン酸は、塩の形となっていてよく、遊離のものと塩の形のものが混在してよい。

FGFMテインをグリコサミノグリカンに水媒体中で接触させる際に、グリコサミノグリカンの使用量は、FGFMテイン1モルに対し、グリコサミノグリカンが約0.1～100モル、さらに好ましくは約0.5～4モルの範囲で加えることが好ましい。

水媒体中におけるグリコサミノグリカンの濃度は、約0.0005～5%が好ましく、さら

げられる。

本発明で用いられるグリコサミノグリカンは、遊離のものでも良く、また塩の形のものでも良い。該塩としては、たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、トリメチルアンモニウム塩などが挙げられる。

また、FGFMテインに水媒体中で接触させる際に、グリコサミノグリカンの遊離のものを加え、次に適当量のアルカリまたは酸を加えて所望のpHにしてよい。アルカリを加えることにより、グリコサミノグリカンは、水媒体中で塩の形となっていてよく、遊離のものと塩の形のものが混在してよい。

本発明のFGFMテインをグリコサミノグリカンに水媒体中で接触させる際に、さらに二または三塩基性カルボン酸の存在下に行なうと、FGFMテインがより安定化されるので有利である。

該三塩基性カルボン酸としては、たとえば酒石酸、マレイン酸、リンゴ酸、フマル酸などが挙げられる。

に、約0.01～1%が好ましい。

水媒体中におけるFGFMテインの濃度は、約0.0005～5%が好ましく、さらに約0.01～1%が好ましい。

該カルボン酸の使用量としては、水媒体中の濃度が約1.0M～1Mが好ましく、さらに約1.02M～5.00Mが好ましい。

水媒体中で接触させるには、FGFMテイン、グリコサミノグリカン、さらにカルボン酸を水媒体中で単に混合するだけで目的を達し得る。

該水媒体としては、注射用滅菌水を用いるのが好ましい。

混合する際の操作としては、FGFMテイン、グリコサミノグリカン、さらにカルボン酸のそれを水溶液として混合しても良く、また固体のまま添加して水媒体中で溶液と成しても良い。混合の際の温度は約0～40℃、pHは約3～10の範囲にあることが好ましく、さらに約1～4の範囲にあることが好ましい。混合に要する時間は通常約1～30分である。

上記方法により、安定化されたFGFMテインの組成物が得られる。

该安定化されたFGFMテイン組成物中では、FGFMテインとグリコサミノグリカンとは一定の割合で結合し複合体を形成して存在していると考えられる。したがって、所望により安定化されたFGFMテイン複合体を単離することができる。単離、採取法としては、たとえば、セファデックスやTSKゲルなどを用いるゲルろ過法や、DF-E-またはCM-トヨバールなどを用いるイオノ交換クロマトグラフィー、等電点分画法などが挙げられる。従って、目的に応じてFGFMテイン複合体を単離、採取しても良いし、単離、採取せずにそのまま組成物として用いても良い。

該複合体は、FGFMテインとグリコサミノグリカンとが約1:0.5~約1:5で複合体を形成したものである。なお、該複合体はたとえば1M NaClなどの高濃度の塩類の存在下で解離するので、単離操作中は高いイオン強度を有する溶液の使用を避ける必要がある。

このようにして、安定化されたFGFMテインの複合体あるいは組成物が得られる。すなわち、後述の実施例により示されるように、本発明の複合体あるいは組成物は、熱、pH、プロテアーゼに対して安定である。

特に、本発明の複合体あるいは組成物は、中性条件下においてはもとより、酸性およびアルカリ性条件下においても安定である。

该安定化されたFGFMテイン複合体もしくは安定化されたFGFMテイン組成物は、そのまま、または他の生理学的に許容されうる固体、賦形剤、希釈剤とともに医薬組成物(例、注射剤、錠剤、カプセル剤、液剤、軟膏)として、温血動物(例、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、犬、ネコ)に対して経口的または経皮的に安全に投与することができる。

該製剤としては、たとえば、注射剤、注射投与に用いるための溶液、被結晶もしくは被結乾燥品などの形態にするのが好ましい。

医薬組成物としての製剤化にあたっては、公知

の製剤学的製造法に準じ、所望により製剤学的に許容され得る添加剤、希釈剤、賦形剤などを用いる。

たとえば、注射用水溶液剤とする場合は、水性溶剤(例、蒸留水)、水溶性溶剤(例、生理的食塩水、リンゲル液)、油性溶剤(例、ゴマ油、オリーブ油)等の溶剤、または所望により溶解補助剤(例、ナリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム)、破壊剤(例、クエン酸ナトリウム、グリセリン)、等強化剤(例、ブドウ糖、炭化鉄)、安定剤(例、ヒト血清アルブミン、ポリエチレンジリコール)、保存剤(例、ベンジルアルコール、フェノール)、無毒化剤(例、塩化ベンゼルコニウム、塩酸プロカイン)等の添加剤を用いて、常法手段により製造される。

また、たとえば固型状注射用製剤とするには、希釈剤(例、蒸留水、生理的食塩水、ブドウ糖)、賦形剤(例、カルボキシメチルセルロース(CMC)、アルギン酸ナトリウム)、保存剤(例、ベンジルアルコール、塩化ベンゼルコニウム、フェノール)、無毒化剤(ブドウ糖、アルコン酸カルシウム、塩酸プロカイン)等を混合し、常法手段により、固型状

注射用製剤に製造することができる。

さらに、製剤化にあたっては、ブドウ糖などの単糖類や、アミノ酸、各種塩類、ヒト血清アルブミンなどを添加しても良く、その他に等強化剤、pH調節剤、無毒化剤、防腐剤などを加えて安定で有効なFGFMテイン製剤を調製することができる。

上記の方法により得られるFGFMテイン複合体もしくは組成物は組織芽細胞の増殖を促進させる作用等を有し、安定性が高く、毒性は低いので、火傷、創傷、術後組織などの治療促進剤、あるいは血管新生作用による血栓症や動脈硬化症などの治療薬として用いることができる。また、細胞培養を促進させるための試薬として用いることができる。

本発明の方法により得られたFGFMテイン複合体もしくは組成物を上記した医薬として用いる場合には、たとえば上記した温血動物に、投与カート、症状などを考慮して、FGFMテインの量として1日量約1kgないし100mg/kgの中か

ら適当量を選んで投与される。

また、本発明方法により得られたPGFMテイン複合体もしくは組成物を細胞培養を促進させるための試薬として用いる場合、PGFMテインの量として培地1mlあたり約0.01~10μg、さらに併用して約0.1~10μgとなるように培地に加えることが好ましい。

このようにして、PGFMテインにグリコサミノグリカンを水溶液中で接触させることにより、PGFMテインを安定化することができ、また安定化されたPGFMテイン複合体を得ることができるので、PGFMテインを安定な作用を持続させたままで製剤化できる。

後述の参考例1において用いられたプラスミドpTB669を保持する形質転換体エシエリキア・コリ(Escherichia coli)K12 MM294/pTB669(IFO 14532, FERM BP-1281)は、ヨーロッパ特許出願公開第237,966号公報の実施例3に記載の方法で製造されたものである。

後述の実施例において用いられたリコンビナントヒト増殖性PGFMテインCS23(以下、rbPGFMテインCS23と略称することもある。)は、[C:特許出願第63-50249号明細書、ヨーロッパ特許出願第88103047, 2号明細書、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ第151巻第701~708頁(1988年)に記載の方法で製造される。すなわち、該rbPGFMテインCS23は、形質転換体エシエリキア・コリMM294/pTB762(IF0 14613, FERM BP-1645)を用いて、後述の参考例1~3(上述の文献等に記載の方法と同様の方法である。)に記載の方法で製造、精製されたものである。

上述の形質転換体E. coli K12 MM294/pTB669(後述の参考例1において用いられたプラスミドpTB669を保持する。)、およびE. coli MM294/pTB762(後述の参考例3参照)は、財團法人发酵研究所(IF0)および

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FR1)に寄託されている。これらの受託番号および受託日を次の表1に示す。なお、FR1への寄託については、当初国内寄託がなされFERM番号で示される受託番号が付され、後寄託はブンペスト協約に基づく寄託に切りえられて、FERM-BP番号で示される受託番号が付され、同研究所(FR1)に保管されている。

(以下余白)

E. coli MM294/pTB762	IF0 14613	FERM P-9409	FERM BP-1645	(W/16246/5/27)(W/16246/6/11)
E. coli MM294/pTB669	IF0 14532	FERM P-8918	FERM BP-1281	(W/16191/8/12)(W/16191/8/11)
E. coli MM294/pTB669	IF0 14532	FERM P-8918	FERM BP-1281	(W/16191/8/12)(W/16191/8/11)

なお、以下の参考例におけるヒトTGFのアミノ酸配列のアミノ酸の番号は、第1回に示されたヒトTGFのアミノ酸配列のN末端のMetを第1番目として取るものとする。

参考例1 (ムテインをコードする塩基配列を有する組換えDNAの製造)

(1) ヒトTGF遺伝子のM13ベクターのクローニング:

ヨーロッパ特許出願公開第237,966号公報明細書の実施例3で得られたプラスミドpTB669を制限酵素EcoRI及びBamHIで消化させた。ファージベクターM13sp8(ジェイ・メッシング(J. Messing), メソッズ・イン・エンジニアロジー, 101, 20~78(1983))複製型(RF)DNAを制限酵素EcoRI及びBamHIで消化させ、予めEcoRI及びBamHIで消化させてあったpTB669由来のヒトTGF DNA断片と混合した。次に混合物をT4 DNAリガーゼで連結させ、連結DNAを大腸菌-JM105細胞の被感染能力のある固体中へ形質転換させ、

Xgalを指示薬とするプレート上に播き(ジェイ・メッシング等, ニュークレイック・アッシュ・リサーチ(Nucleic Acids Res.) (1981) 9巻309~321頁)、組換えファージを含むするブラーク(白いブラーク)を拾い上げ、組み換え部分の塩基配列をジデオキシヌクレオチド合成剤停止法(J. Messing ら, ニューカレイック・アッシュ・リサーチ(Nucleic Acids Res.) 9, 309 (1981)]によって決定して、ヒトTGF DNAが正確に挿入されていることを確認した。

このM13-P0クローンから1本鎖ファージDNAを精製し、合成オリゴヌクレオチドを使用する特定部位指向性変異誘発の講型として用いた。

(2) サイト特異的突然変異誘発

0.1 mMアデノシン三磷酸(ATP)、50 mMヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩(トリス-HCl) pH 8.0、1.0 mM MgCl₂、5 mMジチオスレイトール(DTT)及びT4キナーゼ9単位の存在下に、50 μl中で合成オリゴヌクレオチド

5' >CGT TCT TGC TGT ACA
GCC GCT <3'
(Cys26をSerに変更するためのプライマー(制限酵素RsaIの認識配列が消失する。)) 40ピコモルをT4キナーゼにより37°Cで1時間処理した。5.0 mM NaCl、1.0 mMトリス-HCl、pH 8.0、1.0 mM MgCl₂及び1.0 mM β-メルカプトエタノールを含有する混合物50 μl中にて、このキナーゼ処理されたプライマー(12ピコモル)を67°Cで5分、及び32°Cで25分加熱することによって1本鎖(ss)M13-P0 DNA 5 μgに複製形成させた。アニーリングした混合物を次に水上で冷却し、0.5 mM各デオキソヌクレオチド三磷酸(dNTP)、80 mMトリス-HCl、pH 7.4、8 mM MgCl₂、1.0 mM NaCl、DNAポリメラーゼI Kleow 断片9単位、0.5 mM ATP及びT4 DNAリガーゼ2単位を含有する反応混合物50 μlに添加し、37°Cで3時間及び25°Cで2時間反応し、0.2 mM EDTA 2 μlを加え反応を停止した。複

合能能力のあるJM105細胞の形質転換に使用し、液を一夜培養させ、培養基上澄液からssDNAを単離した。このssDNAをプライマー伸長の第二サイクルに講型として使用し、ゲル精製されたRF型DNAを被感染能力のあるJM105細胞中へ形質転換させ、寒天プレート上に播き、一夜培養するとファージブラークが得られた。

(3) 特定部位指向性変異誘発:

上の(2)項の操作をくり返すが、但し使用の合成オリゴヌクレオチドプライマーは、システイン70を暗号づけるものからセリンを暗号づけるもので

5' >AAC GAT TAC CGC TC
A CTC C <3'
とする。(制限酵素HaeIIの認識配列が生成される)

(4) 特定部位指向性変異誘発:

上の(2)項の操作をくり返すが、但し使用の合成オリゴヌクレオチドプライマーは、システイン88を暗号づけるものからセリンを暗号づけるもので

5' >GTA ACA GAC TTA GA
A CCT ACT <3'

とする。(制限酵素Alu Iの認識配列が生成される)

(5) 特定部位指向性変異誘発:

上の(2)項の操作をくり返すが、但し使用の合成オリゴヌクレオチドプライマーは、システイン93を暗号づけるものからセリンを暗号づけるもので

5' >TCG AAG AAG AAA GA
C TCA TCC <3'

とする。(制限酵素Hinf Iの認識配列が生成される)

(6) 突然変異誘発導化されたブラークのふるい分けと同定:

突然変異させたM13-P0ブラークの入ったプレート皿(上記(1)項)並びに突然変異しないM13-P0ファージブラークの入った2枚のプレートを4℃で冷却し、各プレートからのブラークを2枚のニトロセルロース円形フィルター上へ、

第一フィルターの場合には乾燥フィルターを重天プレート上へ5分置ね、第二フィルターの場合は15分置ねて移した。次に0.2N NaOH, 1.5M NaCl及び0.2% Triton X-100に5分置した母子のろ紙上へフィルター皿を置き、次に0.5M Tris-HCl pH 7.5、及び1.5M NaClに浸したら母子のろ紙上へ更に5分置ねて中和した。フィルター皿を同様なやり方で2×SSC(標準ケン酸塩)に浸した後フィルター上で2回洗い、乾燥し、真空乾燥炉内で80℃で2時間乾燥させた。重複フィルター皿をフィルター当たり10mCiのDNA合成形成液(5×SSC), pH 7.0, 4×デンハード液(ポリビニルピロリドン、フィコール及び牛血清アルブミン, 1×=各0.0.2%), 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), 5.0 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0及び100μg/mlの、変性サケ精子DNAにより、55℃で4時間、重複形成させた。オリゴヌクレオチドプライマーを10³cpm/mlに42℃で24時間重複形成させた。0.1% SDSと減少

量のSSCを含むする変性用緩衝液中でそれぞれ30分、50℃でフィルター皿を洗った。フィルター皿を、初めに2×SSCを含んだ緩衝液で洗い、突然変異化されないM13-P0ブラークを含むる特異フィルターはガイガーメータ用いて放射能の存在について検査した。SSC濃度を段階的に低下させ、未突然変異M13-P0ブラークをもつ特異フィルター上に検出可能な放射能が明らかなくなるまでフィルター皿を洗った。SSCの使用最終濃度は0.1×SSCであった。フィルターを空気乾燥し、-70℃で2~3日露光してオートラジオグラフをとった。突然変異したM13-P0のブラーク10000個と突然変異されない特異ブラーク100個をキナーゼ処理したオリゴヌクレオチドアコープによってふるい分けた。特異ブラークではプローブと重複形成したものが全く存在せず、一方突然変異されたM13-P0ブラーク3~10個がプローブと重複を形成した。

突然変異M13-P0ブラークの1個を取り上

げ、JM105培養基へ接種した。上澄液からssDNAをつくり、固体ペレットから2本鎖(ds)DNAをつくった。適当なオリゴヌクレオチドプライマーとssDNAを使用して塩基配列を解析した。

その結果、TGC(Cys26)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys70)コドンがAGC(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys88)コドンが、TCT(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys93)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたことがそれぞれ確認された。

変異したM13-P0ファージのうち、コドンCys-26がSerになったものをM13-P1、コドンCys-70がSerになったものをM13-P2、コドンCys-88がSerになったものをM13-P3、コドンCys-93がSerになったものをM13-P4とした。

参考例2 (突然変異誘発導化されたブラークのふるい分けと同定)

参考例1で得られた突然変異させたM13-P2ファージブラークの入ったプレート残渣びに参考例1で得られた突然変異しないM13-P2ファージブラークの入った2枚のプレートを1つに冷却し、各プレートからのブラークを2枚のニトロセルロース円形フィルター上へ、第1フィルターの場合には乾燥フィルターを導入プレート上へ5分置ね、第2フィルターの場合は15分置ねて移した。次に0.2N NaOH、1.5M NaCl及び0.2%トリトンX-100に5分浸した厚手のろ紙上へフィルター頭を置き、次に0.5Mトリス-HCl pH7.5、及び1.5M NaClに没したろ紙上へ更に5分置ねて中和した。フィルター頭を同様なやり方で2×SSC(標準クエン酸鈉)に没したフィルター上で2回洗い、乾燥し、真空乾燥炉内で80℃で2時間乾燥させた。重複フィルター頭をフィルター当たり10枚のDNA電気形成緩衝液(5×SSC), pH7.0, 0.4×デンハード液(ポリビニルピロリドン、フィコール及び牛血清アルブミン、1×=各0.02%)。

クレオチドプローブによってふるい分けた。对照ブラークではプローブと複合形成したものが全く存在せず、一方突然変異されたM13-P2ブラーク3~10個がプローブと複合を形成した。

突然変異M13-P2ブラークの1個を取り上げ、JM105培養基へ接種した。上澄液からssDNAをつくり、菌体ペレットから2本鎖(ds)DNAをつくり、適当なオリゴヌクレオチドプライマーとssDNAを使用して塩基配列を解析した。

その結果、TGC(Cys26)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys88)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys93)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたことがそれぞれ確認された。

変異したM13-P2ファージのうち、コドンCys-26および-70がSerになったものをM13-P12、コドンCys-70および-88がSerになったものをM13-P23、コドンCys-70および-93がSerになったものをM13

0.1%ドニル硫酸ナトリウム(SDS)、5.0 mM堿性ナトリウム緩衝液、pH7.0及び1.00 μg/mlの、異性サケ精子DNAにより、55℃で1時間、導筋複合形成させた。オリゴヌクレオチドプライマーを1.0³cpm/mlに4.2°Cで24時間複合形成させた。0.1%SDSと減少量のSSCを含有する洗浄用緩衝液中でそれぞれ30分、50℃でフィルター頭を洗った。フィルター頭を、初めに2×SSCを含んだ緩衝液で洗い、突然変異化されないM13-P2ブラークを含有する对照フィルターはガイガーカウンタを用いて放射能の存在について検査した。SSC濃度を段階的に低下させ、未突然変異M13-P2ブラークをもつ对照フィルター上に検出可能な放射能が残らなくなるまでフィルター頭を洗った。SSCの使用最低濃度は0.1×SSCであった。フィルターを空気乾燥し、-70°Cで2~3日露光してオートラジオグラフをとった。突然変異したM13-P2のブラーク1000個と突然変異されない对照ブラーク100個をキナーゼ処理したオリゴヌ

-P24とした。

参考例3 (ヒトFGFのムテインをコードする遺伝子の大腸菌における発現)

前記参考例2で得られたM13-P23のレブリカティブファーム(RP)を制限酵素EcoRIおよびPstIで切断し、ヒトFGFのムテインをコードする領域を含む約0.5Kb DNA断片を得た。

一方、trpプロモーターを有するプラスミドpTRP781(Kurokawa, T. らニュークレイック・アシックス・リサーチ(Nucleic Acids Res.)11, 3077-3085(1983))DNAをEcoRI-PstIで切断して、trpプロモーター、テトラサイクリン耐性遺伝子およびプラスミド複製開始部位を含む約3.2Kb DNA断片を分離した。ヒトFGFのムテインをコードする遺伝子領域を含む前記0.5Kb EcoRI-PstI DNA断片と、この3.2Kb DNA断片をT4DNAリザーゼ反応により結合させヒトFGFのムテイン発現用プラスミドPTB762

を構築した。

このプラスミド pTB762 を用いて大腸菌 MM294 を形質転換させることによりムテイン C23 をコードする遺伝子を含むプラスミド pTB762 を含む菌株 *E. coli* MM294/pTB762 (IFO 14613, FERM BP-1645)を得た。

(2) 固体抽出液の調製

前記形質転換体を、それぞれ 1% グルコース、0.4% カゼミノ酸、8 μg/ml デトロサイクリンを含む M9 培地で培養し、Klett 値が約 200 の時点で、3 日インドリールアクリル酸を 25 μg/ml になるように添加し、さらに 4 時間培養した。培養後、固体を吸め、1/20 倍の 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10% シュークロース溶液に懸濁した。この懸濁液にフェニルメチルスルホニルフルオライド (PMSF) を 1 mM, EDTA を 10 mM, NaCl を 0.1 M, スペルミジン酸塩を 10 mM, リゾチームを 100 μg/ml (いずれも最終濃度)となるように添加し、0°C.

45 分攪拌後、30 秒間超音波処理を加えた。

この懸濁液を 18000 rpm (サーバル遠心機, SS 34 ローター) 30 分間遠心して上清を得、液体抽出液とした。

(3) 固体抽出液のヒト FGF 活性

マウス BALB/c 3T3 細胞を 5% 仔牛血清を含む DMEM 培地に厚植し、タンク 96 穴マイクロタイターブレート (平底) に 1 穴あたり 0.2 ml (2×10^3 細胞) ずつ播種して、培養し、翌日、0.5% 仔牛血清を含む DMEM 培地に交換した。3 日間培養したのち 0.5% BSA を含む DMEM 培地で 5 倍ずつ段階的に希釈した固体抽出液を 1 穴あたり 10 μl ずつ添加して、培養し、20 時間後に 3 H-Tdr (5 Ci/mmol, 0.5 nCi/ml RCC Auerbach) を各穴に 2 μl ずつ加えた。6 時間後に細胞を 0.2% トリプシン-0.02% EDTA を含むリン酸緩衝液 (PBS) 処理ではがし、タイターテックセルハーベスターを用いて、グラスフィルター上に細胞を捕集し細胞に取り込まれた 3 H-Tdr 量をシンチレーションカウンタ

にて測定した。

その結果、*E. coli* MM294/pTB762 の固体抽出液は、FGF 活性を示した。

このようにして、ヒト FGF の 70 位および 88 位の Cys がそれぞれ Ser に置換された rbbF-CF ムテイン CS23 が得られた。

(4) 上記(3)で得られた抽出液 25 ml (培養液 500 ml より調製) を 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 M NaCl 溶液で平衡化した DEAE セルロース (DE52, フットマン社, 米国) カラム (径 2×10 cm) に通し、抽出液中の核膜成分を除去した。カラムからの漏過液および 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 M NaCl 濃度でのカラム洗浄液を合わせて貯めた (DEAE 補過り漏分 60 ml)。

この漏分をヘパリンカラム Shodex AF-pak II R-894 (8 ml D × 5 cm, 明和電工製) を装備した高速液体クロマトグラフィー装置 (ギルソン社, フランス) にかけた。カラムを、20 mM Tris-HCl, pH 7.4 濃度、次いで 20 mM

Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl 溶液で洗った後、20 mM Tris-HCl, pH 7.4, パッファー中、0.5 M から 2 M の NaCl の直線勾配溶出 (linear gradient elution, 60 ml, 流速 1.0 ml/min) を行った。

流出時間 15 ~ 25 分の間に溶出されたビーグル画分が rbbF-CF ムテイン CS23 を含むことが分かったので、この画分を採取した。宝酒造株式会社製の牛胎盤 FGF (純度 95% 以上) の FGF 活性を基準とする比活性は、1.1 ng-protein FGF/ng protein であった。

参考例 4 (内皮細胞を用いるヒト FGF の活性測定法)

前述の実験例における FGF 活性の測定は、次に示す方法によって行なった。

10% 仔牛血清を含む DMEM 培地で 2 倍ずつ段階的に希釈した試料をタンク社製 96 穴マイクロタイターブレート (平底) に 1 穴あたり 50 μl を添加したのち、アメリカンタイプカルチャーコンテンダー (ATCC) から購入した牛胎盤内皮

細胞(CRL 1395)を1穴あたり $5.0 \mu\text{l}$ (2×10^3 個)ずつ播種し、3日間培養した。その後、MTT液液(5mg/ ml PBS、シグマ社)を各穴に $20 \mu\text{l}$ ずつ加えた。4.5時間後10%SDS-0.01N HClを $100 \mu\text{l}$ 加え一晩培養器内で放置したのち、タイターテックマルチスキャナを用いて 590 nm における吸光度を測定した[多田ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッドズ(Journal of Immunological Methods):93巻、157頁(1986年)]。

実験例1

2.0nM リン酸緩衝液(pH 7.4)に、参考例3で得られたrhbFGFムテインCS23を $2.00 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えたものに、ヘパリンナトリウム(分子量6,000~25,000)もしくは低分子量ヘパリンナトリウム(分子量3,900~6,400)を添加して37℃で4時間インキュベートした。ヘパリンナトリウムの終濃度を $2.00 \mu\text{g}/\text{ml}$ (モル比1:1)および $2 \text{mg}/\text{ml}$ (モル比1:10)に、低分子量ヘパリンナトリウムの

終濃度 $6.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ (モル比1:1)に設定した。対照群として無添加群を置いた。4.8時間後の残存活性を表2に示す。対照群では、FGF活性はほとんど失われたにしかかわらず、ヘパリンナトリウムおよび低分子量ヘパリンナトリウム添加群ではFGF活性が安定に保持されていた。

表2

添 加 物	モル比	残存 FGF 活性(%)
ヘパリンナトリウム	1:1	100
ヘパリンナトリウム	1:10	100
低分子量ヘパリンナトリウム	1:1	100
無 添加		3

実験例2

ウシ胎児血清を10%含有するグルバコMEM培地に、参考例3で得られたrhbFGFムテインCS23を $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えたものに、ヘパリンナトリウム(分子量6,000~25,000)、ヘパラン硫酸ナトリウム(分子量10,000~15,000)またはデルマタンを

硫酸ナトリウム(分子量11,000~25,000)のグリコサミノグリカン類を終濃度 $5.00 \mu\text{g}/\text{ml}$ または $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加して37℃で4時間インキュベートした。対照群として無添加群を置いた。4.8時間後の残存活性を表3に示す。対照群では、FGF活性はほとんど失われたにもしかかわらず、グリコサミノグリカン類添加群ではFGF活性が安定に保持されていた。

表3

添 加 物	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	残存 FGF 活性(%)
ヘパリンナトリウム	5.00	100
ヘパリンナトリウム	2.5	100
ヘパラン硫酸ナトリウム	5.00	100
ヘパラン硫酸ナトリウム	2.5	98
デルマタン硫酸ナトリウム	5.00	95
無 添加	-	0

実験例3

5.0nM のクエン酸ナトリウム(pH 7.4)溶液に、参考例3で得られたrhbFGFムテインCS23を $1.00 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えたものに、

ヘパリンナトリウム(平均分子量12,000)を終濃度 $7.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ (モル比1:1)になるように添加して37℃で4時間インキュベートした。対照としてヘパリンナトリウム無添加群を置いた。30分および4時間後の残存活性を表4に示す。表4に示された結果から明らかなように、対照群ではFGF活性は低下したにしかかわらず、ヘパリンナトリウム添加群では、高濃度においてもFGF活性の低下が防がれている。

表4

添 加 物	インキュベー ンション時間	残存 FGF 活性(%)
ヘパリンナトリウム	30分	93
ヘパリンナトリウム	4時間	97
ヘパリンナトリウム	16時間	71
無 添加	30分	53
無 添加	4時間	4
無 添加	16時間	0

実験例4

2.0nM のリン酸緩衝液(pH 7.0)に参考例3で得られたrhbFGFムテインCS23を $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$

/mlになるように加えたものに、ヘパリンナトリウム(平均分子量12,000)を終濃度7.3μg/ml(モル比1:1)になるように添加して37℃でpH3.0, 5.0, 7.4および9.7の条件下に2時間インキュベートした。及5に2時間後の残存FGF活性を示す。

及5に示した結果から明らかなように、いずれのpHにおいても対照群ではFGF活性は著しく低下したにもかかわらず、ヘパリンナトリウム添加群ではFGF活性が高く保持されていた。

及5

添加物	pH	残存FGF活性(%)
ヘパリンナトリウム	3.0	7.0
ヘパリンナトリウム	5.0	100
ヘパリンナトリウム	7.4	9.8
ヘパリンナトリウム	9.7	8.5
無添加	3.0	3.0
無添加	5.0	4.5
無添加	7.4	6.0
無添加	9.7	2.8

実験例5

参考例3で得られたrhbFGFMテインCS 2.3を1.00μg/mlに、平均分子量12,000のヘパリンナトリウムを7.3μg/ml(モル比1:1)になるように8.0MのHClに添加した後、ペプシンを1μg/mlになるように加えた(最終pH2.1)。ヘパリンナトリウム無添加群を対照とした。反応液を37℃で30分間インキュベートし、残存FGF活性を測定した(及6)。対照群ではFGF活性はほとんど失われたにもかかわらず、ヘパリンナトリウム添加群ではFGF活性が安定に保持されていたことから、ペプシン消化に対してもrhbFGFMテインCS 2.3が安定化されたことが分かる。

及6

添加物	残存FGF活性(%)
ヘパリンナトリウム	100
無添加	0

実験例6

参考例3で得られたrhbFGFMテインCS 2.3(9.80μg/ml)1mlと平均分子量4,900の低分子量ヘパリンナトリウム(3.00μg/ml)1mlとを混合した。混合液の7.50μlをTSK-ゲル3000SW(渡ソー社製)カラム(0.75×60cm)に通し、0.1M Na₂SO₄を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)を用いて溶出した。溶出速度は1.0ml/min、検出波長は230nm。混合液は唯一のピーク(ピーク1)を与えた(第2図)。ピーク1を分離して分析した結果、rhbFGFMテインCS 2.3と低分子量ヘパリンナトリウムとをモル比1:2の割合で含有する両者の複合体であった。rhbFGFMテインCS 2.3および低分子量ヘパリンナトリウムを単独で含有した場合の溶出位置を第2図中にそれぞれ△および▽で示した。複合体はrhbFGFMテインCS 2.3および低分子量ヘパリンナトリウムよりも高分子量側に溶出された。その分子量は第2図より約70,000とな
示された。

実験例7

参考例3で得られたrhbFGFMテインCS 2.3, 0.5μg;ヘパリン硫酸ナトリウム, 0.37μg;クエン酸ナトリウム1.5μgを含む溶液(pH7.4)を調製して、安定な注射液を得た。

危険の強度

FGFMテインにグリコサミノグリカンを水性媒液中で接触させることにより、FGFMテインを安定化させることができる。ドロドムテインを安定な作用を発揮させたまま固形化することができる。

4. 図面の簡単な説明

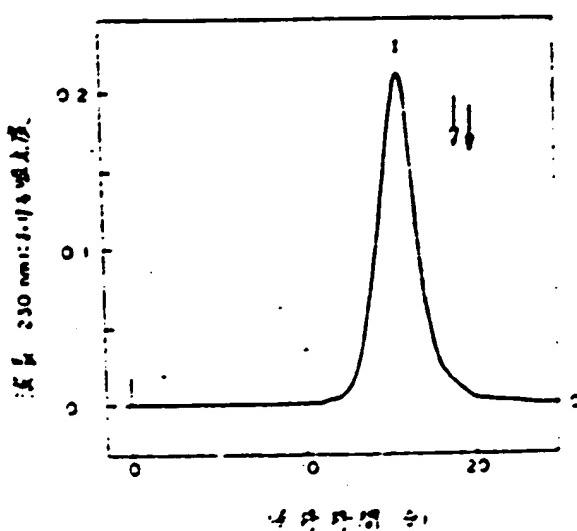
第1図は、ヒトFGFをコードする遺伝配列と、それから推測されるアミノ酸配列とを示す。

第2図は、実験例6で得られた、rhbFGFMテインCS 2.3と低分子量ヘパリンとの複合物のゲルろ過パターンを示す。

图 1 □

HetProAlaLeuPr GluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTCCCCGCCACTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
CTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTCAAGCAGAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu	100
CGAACGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTGTTTTTGAAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACCTGGATCCAAAACAGGACCTGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProHetSerAlaLysSer	147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444

图 2 □



THIS PAGE BLANK (USPTO)